# 斜纹夜蛾羧酸酯酶基因的克隆、序列分析及表达水平

黄水金，秦文婧，陈　琼
（江西省农业科学院植物保护研究所，南昌 330200）

**摘要**：为了明确斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 对溴氰菊酯产生抗性的分子机理，本研究利用 RT-PCR 技术和 RACE 方法获得了 1 个斜纹夜蛾羧酸酯酶基因的全长 cDNA 序列，命名为 *Slest2*。序列分析表明，该 cDNA 全长 1 796 bp（GenBank 登录号：DQ445461），5′和 3′UTR 区分别长 63 和 119 bp，开放阅读框编码一个由 537 个氨基酸残基组成的羧酸酯酶蛋白。通过对氨基酸同源性分析表明，该羧酸酯酶与其他物种的酯酶均具有很高的氨基酸相似性，并具有多个在不同酯酶蛋白家族中均保守的区域。采用实时定量 PCR 技术比较了 *Slest2* 在斜纹夜蛾抗、感品系中的表达水平。当以 cDNA 为模板检测 mRNA 转录水平时发现，*Slest2* 在抗性品系中的转录水平是敏感品系的 46.85 倍；以基因组 DNA 为模板检测 *Slest2* 基因的拷贝数时发现，*Slest2* 在抗、感性品系中的拷贝数无显著差异（前者为后者的 1.16 倍）。这些结果表明，抗性与敏感品系具有相似的 *Slest2* 基因拷贝数，但它们在抗性品系中的转录水平显著升高。由此推测 *Slest2* 基因的转录水平升高与斜纹夜蛾对溴氰菊酯的抗药性密切相关。

**关键词**：斜纹夜蛾；酯酶；抗药性；抗性品系；敏感品系；序列分析；实时定量 PCR
**中图分类号**：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)01-0029-09

# Cloning, sequence analysis and expression levels of a carboxylesterase gene from *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)

HUANG Shui-Jin, QIN Wen-Jing, CHEN Qiong (Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

**Abstract**: In order to clarify the molecular mechanisms of deltamethrin resistance in *Spodoptera litura* (Fab.), the esterase gene of *S. litura* was cloned by using the RT-PCR with degenerate primers and rapid amplification of cDNA ends (RACE) strategies, and designated as *Slest2*. Sequence analysis demonstrated that the fragment was 1 796 bp in full-length with a 63 bp 5′ UTR and 119 bp 3′UTR (GenBank accession no. DQ445461), the open reading frame encoded a 537-amino-acid protein. Homology analysis indicated that the deduced amino acid residues of *Slest2* had very high similarity with those from other species, and contained several conserved domains in all esterase proteins. The relative expression level of *Slest2* was compared between the resistant strain and the susceptible strain using real-time quantitative PCR technique. The transcription level of *Slest2* tested with cDNA as template in the resistant strain was 46.85-fold as high as that in the susceptible strain. However, the test with gDNA as template indicated that the resistant strain and the susceptible strain had similar gene copies of *Slest2* (the former was 1.16-fold as high as the latter). The results suggest that the higher transcription level of *Slest2* contributes to insecticide resistance in *S. litura*.

**Key words**: *Spodoptera litura*; carboxylesterase; insecticide resistance; resistant strain; susceptible strain; sequence analysis; real-time quantitative PCR

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fab.)是一种世界性分布的重要农业害虫。寄主植物已知有 109 科 389 种，尤以棉花、烟草、大豆、玉米和甘蓝等作物受害最重（秦厚国等，2004，2006）。20 世纪 90 年代以前，斜纹夜蛾在我国为间歇性发生。自 20 世纪 90 年代开始，随着我国作物布局改变、转 Bt 抗虫棉的推广、复种指数的增加、农事管理与农业生态系统的变化，该虫在我国发生的地区不断扩大，危害程度也日趋严重（高春先等，2004）。长期以来，国内外对斜纹夜蛾的防治主要依靠使用化学药剂。由于大量频繁用药，导致其对有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯等多类杀虫剂产生了不

基金项目：江西省自然科学基金项目（2008GZN0010）
作者简介：黄水金，男，1974 年生，江西兴国人，博士，副研究员，主要从事昆虫分子毒理学研究，E-mail：shuijinhuang@yahoo.com.cn
收稿日期 Received：2009-08-30；接受日期 Accepted：2009-12-18

同程度的抗药性(Armes *et al.*, 1997; Kranthi *et al.*, 2001, 2002; Huang *et al.*, 2006)。多数常规药剂防治效果显著下降,已不能有效地控制其为害。因此,研究斜纹夜蛾的抗药性机理及其抗药性治理技术,对于保护现有的农药品种,延长其使用寿命,降低害虫防治成本具有非常重要的意义。

目前尽管有不少关于斜纹夜蛾对诸多杀虫剂产生抗药性的报道,但对其抗性机制的研究不多。例如,在印度,有些田间种群对有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂产生较高水平的抗性(Armes *et al.*, 1997; Kranthi *et al.*, 2001, 2002);采用酶抑制剂的增效试验表明,斜纹夜蛾对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性与多功能氧化酶有关,对有机磷的抗性可能与酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶有关(Armes *et al.*, 1997);韩国学者对实验室选育的抗性品系的生化研究表明,酯酶与斜纹夜蛾对有机磷和拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性均有关(Cho *et al.*, 1999)。笔者以前的增效试验结果表明,在斜纹夜蛾的溴氰菊酯高抗品系中,羧酸酯酶的抑制剂 TPP,能够对溴氰菊酯产生较强的增效作用,增效倍数达 10 倍;进一步的酯酶活性测定结果表明,在斜纹夜蛾 3 龄幼虫中,溴氰菊酯高抗品系的酯酶活性是敏感品系的 5 倍。这些结果均显示酯酶在斜纹夜蛾对溴氰菊酯的抗性中发挥了重要的作用(Huang and Han, 2007)。为了明确斜纹夜蛾对溴氰菊酯产生抗性的分子机理,我们根据已报道的羧酸酯酶的保守区设计简并引物,克隆获得了 1 个斜纹夜蛾的酯酶基因,并采用实时定量 PCR 技术比较了该基因在斜纹夜蛾抗性和敏感品系中的表达差异,以期从分子水平上阐明羧酸酯酶与斜纹夜蛾抗药性的关系。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试昆虫

敏感斜纹夜蛾品系:由江苏省农业科学院植物保护研究所友情赠送,在本研究室内利用单卵块筛选 2 代,并在未接触任何杀虫剂的条件下用人工饲料按朱丽梅等(2001)的方法连续饲养至今。

抗性斜纹夜蛾品系:在实验室内对采自南京浦口国家大豆改良中心试验场的田间种群用溴氰菊酯高剂量连续多代筛选而获得的品系。该品系对溴氰菊酯的抗性倍数为 2 246 倍,对辛硫磷的抗性为 31 倍,对灭多威的抗性为 15 倍(Huang and Han, 2007)。

## 1.2 酯酶基因 cDNA 克隆和序列测定

用 SV total RNA 抽提试剂盒(Promega 公司)提取斜纹夜蛾 3 龄幼虫的总 RNA 并反转录成第一链 cDNA。根据已报道并在 GenBank 登录的羧酸酯酶的保守区域,设计 1 对简并引物:CbF(5′-GGNATDCCNTAYGCNCARCCNCC-3′)和 CbR(5′-TGRTCYTTNARNCCNGCRTTNCC-3′)用于克隆斜纹夜蛾的羧酸酯酶 cDNA 片段。PCR 反应程序为:94℃变性 3 min;80℃保温加入 0.5 μL Taq 酶[宝生物工程(大连)有限公司];94℃变性 1 min;退火 2 min,退火温度由 65℃降至 50℃,每个循环降落 0.5℃;72℃延伸 2 min;共 31 个循环。随后 94℃变性 1 min;50℃退火 2 min;72℃延伸 2 min,共 11 个循环;最后 72℃延伸 7 min。琼脂糖凝胶电泳切胶回收 PCR 产物(393 bp),利用 Wizard PCR Preps DNA 试剂盒(Promega 公司)纯化。将纯化产物连接至 pGEM-T easy 质粒载体(Promega 公司),后转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中,经蓝白斑和氨苄筛选,重组质粒经扩大培养,碱裂解法提取质粒 DNA 用于检测。测序工作由 Invitrogen 公司完成。

## 1.3 5′与 3′-RACE cDNA 合成及 RACE 反应

**1.3.1** RNA 的制备与 cDNA 模板的合成:采用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒(SV Total RNA Isolation System Kit)提取的总 RNA 用来合成 5′-RACE 和 3′-RACE cDNA 模板。5′-RACE-ready cDNA 模板的合成按 SMART RACE 试剂盒(Clontech Ltd. Co.,)说明书进行,3′-RACE-ready cDNA 模板的合成则按 3′-Full RACE 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]说明书进行。加样与反应条件设定依说明书,气浴完成。合成的 5′-和 3′-RACE-ready cDNA 模板置于 -20℃保存备用。

**1.3.2** 3′-RACE 扩增体系:共 50 μL 的反应液中含 5 μL 10×LA-Taq DNA 聚合酶反应缓冲液,4 μL 25 mmol/L $MgCl_2$, 8 μL 2.5 mmol/L dNTP, 2 μL 10 μmol/L 3′-RACE 下游引物(AP: 5′-GACTCGAGTCGACATCG-3′), 2 μL 10 μmol/L Slest2-3′ F(5′-AGGCACCGAAACCTCCAAAG-3′), 2 μL 3′-RACE cDNA, 0.5 μL LA-Taq DNA 聚合酶(TaKaRa Co., Ltd.),用去离子灭菌水补足至50 μL 总反应体系。

PCR 反应条件为:94℃加热 3 min,80℃保持,此时加入 LA-Taq 酶,随后进行如下循环:94℃ 1 min,62℃ 1 min,72℃ 3 min,循环次数为 35,最

后在 72℃条件下保持 10 min。

**1.3.3** 5′-RACE 扩增体系：50 μL 的反应液中含 5 μL 10×LA-Taq DNA 聚合酶反应缓冲液，4 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，8 μL 2.5 mmol/L dNTP，2 μL 5′-RACE cDNA ，5 μL 10 × 5′ RACE 通用引物（Universal Primer A Mix，UPM），2 μL 10 μmol/L Slest2-5′R(5′-GGTGACAAGGATGACACCGT GCCTTAC A-3′)，0.5 μL LA-Taq DNA 聚合酶（TaKaRa Co., Ltd.），用去离子灭菌水补足至 50 μL 总反应体系。

PCR 反应条件为：94℃加热 3 min，随后进行如下 3 段 PCR 程序：5 个循环的 94℃ 1 min，68℃ 1 min，72℃ 2 min；5 个循环的 94℃ 1 min，65℃ 1min，72℃ 2 min；25 个循环的 94℃ 1 min，63℃ 1 min，72℃ 2 min；最后 72℃ 延伸 10 min。

上述 5′与 3′-RACE 产物的克隆与测序如前所述。

### 1.4 斜纹夜蛾羧酸酯酶基因全长的验证

根据扩增获得的 5′和 3′端序列设计一对特异性引物（F：5′-TGAATGAGGGTCTGCTG GAGGG-3′；R：5′-AGTGAATCGTCAGGCGTTGGGT-3′），采用 Ex-Taq 酶[宝生物工程（大连）有限公司]进行 PCR 反应，以验证基因的完整性。PCR 反应条件为：94℃加热 3 min，随后进行如下 2 段 PCR 程序：5 个循环的 94℃ 1 min，65℃ 1 min，72℃ 2 min；30 个循环的 94℃ 1 min，62℃ 1 min，72℃ 2 min；最后 72℃ 延伸 10 min。

### 1.5 序列分析与分子进化树的构建

序列分析工作由 Lasergene 或 Vector NTI 软件完成，Blast 相似性搜索在 NCBI 网站进行，Clustal X 和 GeneDoc 软件进行多序列比对，利用 PHYLIP 软件包（http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html）构建分子进化树。

### 1.6 斜纹夜蛾羧酸酯酶基因在抗、感品系中的表达水平分析

**1.6.1** 总 RNA 和基因组 DNA 的制备：按 4 头斜纹夜蛾 3 龄幼虫（12 mg ±3 mg）为一个处理，采用 SV total RNA 抽提试剂盒（Promega 公司）进行抽提总 RNA，-70℃保存备用。采用 UNIQ-10 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒（上海生工生物工程技术服务有限公司）制备基因组 DNA，-20℃保存备用。

**1.6.2** 实时荧光定量 PCR 反应：根据 Livak 和 Schmittgen（2001）报道的方法，在若干对特异性引物中筛选出符合要求（具有扩增特异性和与参照基因的扩增效率一致性）的引物后进行实时荧光定量 PCR 反应，PCR 反应采用荧光染料 SYBR Green Ⅰ 在 ABI Prism 7000（美国应用生物系统公司）中用 0.2 mL薄壁 PCR 管（Axygen，美国）进行。采用 Toyobo 公司生产的 Realtime PCR Master Mix［东洋纺（上海）生物科技有限公司］进行 PCR 反应。25 μL的反应体系：灭菌超纯水 10.5 μL；SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 12.5 μL；10 μmol/L 的上、下游引物各 0.5 μL（表 1）；cDNA（或 gDNA）模板 1 μL。PCR 条件为：95℃ 3 min 一轮，随后 95℃ 30 s、退火 30 s（以持家基因 *EF-1α* 为参照基因，*EF-1α*：60℃；*Slest2* ：59℃），72℃ 45 s 共 40 个循环。用 ABI Prism 7000 SDS 1.1（Sequence Detector System，美国应用生物系统公司）软件进行数据记录分析和产生熔解曲线，阈值线由软件自动设定。每个品系取 3 个样，每个样至少重复 3 次。用灭菌超纯水代替 DNA 模板作为空白对照。

采用比较 $C_T$ 值法的相对定量法（Livak and Schmittgen，2001）来确定基因 *Slest2* 在抗性和敏感品系中的相对表达量。

**表 1　本研究中用于实时定量 PCR 分析的引物**

**Table 1　Primers used for real-time quantitative PCR analysis in this study**

| 基因 Gene | 引物 Primer | 引物序列 Primer sequence (5′-3′) | 产物长度 (bp) Product length | GenBank 登陆号 GenBank accession no. |
|---|---|---|---|---|
| *Slest2* | 正向 Forward | AGGCACCGAAACCTCCAAAG | 121 | DQ445461 |
| | 反向 Reverse | ACAAGCAGTCTTCTTCACCAACTAT | | |
| *EF-1α* | 正向 Forward | AACGGGATTCGCTGTATGG | 220 | DQ192234 |
| | 反向 Reverse | CGAAACCGCTAAATACTATGTCAC | | |

## 2 结果与分析

### 2.1 斜纹夜蛾酯酶基因的克隆

利用简并引物和降落 PCR 技术进行扩增，在 393 bp 左右出现清晰条带，通过胶回收后连接到 pGEM-T easy 载体上并进行测序，将所得序列进行 Blast 和同源性分析，结果表明所获得的片段是斜纹夜蛾酯酶基因 cDNA 片段的一部分，命名为 *Slest2*

```
      GAGTTTTGTTTGGGGCTCTGACCGTTGCGGACGGTGTCCTGAGAGCACAGTGCCGGCCTAAGT
1     ATG GTG CAA GTG AGA GTG AAT GAG GGT CTG CTG GAG GGA GAG CGA GTG GAC AAC CAT TAC
      M   V   Q   V   R   V   N   E   G   L   L   E   G   E   R   V   D   N   H   Y
61    GGA GGC TCC TTC TAT AGC TTC AAG GGA ATA CCA TAC GCG GAG CCA CCA GTC GGG GAT CTG
      G   G   S   F   Y   S   F   K   G   I   P   Y   A   E   P   P   V   G   D   L
121   CGG TTC AAG GCA CCG AAA CCT CCA AAG GCT TGG GGC GGA GTT CGT TCT GCT AAG GAA TTT
      R   F   K   A   P   K   P   P   K   A   W   G   G   V   R   S   A   K   E   F
181   GGC CCG AAA TGC TAC CAA AAT GAC CTT TTC ATG AAC ACT GGA ATA GTT GGT GAA GAA GAC
      G   P   K   C   Y   Q   N   D   L   F   M   N   T   G   I   V   G   E   E   D
241   TGC TTG TAC CTA AAC GTG TAC ACA CCT GAG ATC AAA CCT GAC AAG CCT TTA CCA GTA ATG
      C   L   Y   L   N   V   Y   T   P   E   I   K   P   D   K   P   L   P   V   M
301   TTC TGG ATA CAT GGA GGA GGC TTC TTC TGC GGT AGT GGT AAC GAT GAC CTT TAT GGT CCA
      F   W   I   H   G   G   G   F   F   C   G   S   G   N   D   D   L   Y   G   P
361   GAG TTC CTT GTC AGG CAC GGT GTC ATC CTT GTC ACC ATC AAC TAC AGA GTA GAT GTG CTC
      E   F   L   V   R   H   G   V   I   L   V   T   I   N   Y   R   V   D   V   L
421   GGT TTT CTT TGT TTG GAC ACA GAG GAT ATT CCT GGC AAC GCA GGC ATG AAA GAT CAG GTA
      G   F   L   C   L   D   T   E   D   I   P   G   N   A   G   M   K   D   Q   V
481   CAA GCT CTT AGA TGG GTG AAC AAA AAT ATT GCT AGC TTC GGT GGT GAC CCC AAC AAC GTA
      Q   A   L   R   W   V   N   K   N   I   A   S   F   G   G   D   P   N   N   V
541   ACC ATA TTT GGC GAA AGT GCC GGT GGA GGC AGC GTC AGT TAC CAT TTA ATA TCT CCG ATG
      T   I   F   G   E  [S]  A   G   G   G   S   V   S   Y   H   L   I   S   P   M
601   TCT AAA GGT TTG TTT AAA AGG GCC ATT GCT CAG AGT GGG GCA TCT ACT TCG CCC TGG GCC
      S   K   G   L   F   K   R   A   I   A   Q   S   G   A   S   T   S   P   W   A
661   CAA GCT GTT GAG CCT CGC GAA AGA GCT TTA GCA TTG GCT AGA AGC CTT GGA TTT TAT TCT
      Q   A   V   E   P   R   E   R   A   L   A   L   A   R   S   L   G   F   Y   S
721   GAG GAC GAT AAA GAA TTG TAT GAA TTT TTC AAA AAT CAA CCA AAG GAG TCA ATA GTG TGT
      E   D   D   K   E   L   Y   E   F   F   K   N   Q   P   K   E   S   I   V   C
781   ATT CCT GTA GCA CCA ACA TTC TCC GAA GCC TTC AGG GGT GGG TTA GAA ATC AAC TTC ACT
      I   P   V   A   P   T   F   S   E   A   F   R   G   G   L   E   I   N   F   T
841   GTT GTA AAT GAA AAG AAA TTT GGA GAT AAC GAG AGA TTC TTT TAC GGA GAC ATG CTT GAT
      V   V   N   E   K   K   F   G   D   N   E   R   F   F   Y   G   D   M   L   D
901   GCA GTG TCA AAC GGT GTT CAC GAA GGA GTA GAA ATC ATG ACG GGG ACT ACT ACA GAG GAA
      A   V   S   N   G   V   H   E   G   V   E   I   M   T   G   T   T   T   E  [E]
961   GGT CTC ATT ATT TTC GGA GAC CTA GAG GTT ACT AAA AAG TTA TTA GAA TCA GCA AGA GCA
      G   L   I   I   F   G   D   L   E   V   T   K   K   L   L   E   S   A   R   A
1 021 TTC CCA GAA TCC TTC ATT AGT AAA CAA CTG GCA TTC ACC GTC CCA TTA AAT CAG CAG CTA
      F   P   E   S   F   I   S   K   Q   L   A   F   T   V   P   L   N   Q   Q   L
1 081 AAG ATG GGA AGG GAA TTC AGA AAG TTT TAC TTC AAA GAC CAG GTC AAT ATC CCA AAT GAT
      K   M   G   R   E   F   R   K   F   Y   F   K   D   Q   V   N   I   P   N   D
1 141 TGG GAT AAA TGG ATG AAT TTC GTT TCA ATG CAG ATG TTC GGA TAC CCG ACA ATG CAG TGG
      W   D   K   W   M   N   F   V   S   M   Q   M   F   G   Y   P   T   M   Q   W
1 201 GTG AGA CAT TGT GCT AAA GCG AAG AAA CAC AAG CTG TAT GTG TAT AAG TTT TCT TGT AAG
      V   R   H   C   A   K   A   K   K   H   K   L   Y   V   Y   K   F   S   C   K
1 261 TCT AAG AGA AAT ATG ATA GCT GTT TTG AGA GGA CTC ACT GAG ATG CTT GGA GAC AGA CAA
      S   K   R   N   M   I   A   V   L   R   G   L   T   E   M   L   G   D   R   Q
1 321 GTT ACT TCG CAT GCT GAT GAT ATA GCC TAT CTT TTT AAC CCT AAA CTG ATG AAA TTA AAA
      V   T   S  [H]  A   D   D   I   A   Y   L   F   N   P   K   L   M   K   L   K
1 381 GTG GAC ACT GCT TCA GAG GAG TTC AAG CTG ATA GAA AGA GTG GCA ACG CTT TGG ACT AAT
      V   D   T   A   S   E   E   F   K   L   I   E   R   V   A   T   L   W   T   N
1 441 TTT GCT AAA TAC GGA AAC CCA ACG CCT GAC GAT TCA CTG GGA GTT AAG TGG GCA CCG TAC
      F   A   K   Y   G   N   P   T   P   D   D   S   L   G   V   K   W   A   P   Y
1 501 ACC CTG GAA AAC CAA GAA TAT CTG GAC ATT GGA AAC GAG CTA AAA GCG GGC ACC GCG CCT
      T   L   E   N   Q   E   Y   L   D   I   G   N   E   L   K   A   G   T   A   P
1 561 GAT GCT GAA GAA ACA CAA TTC TGG GAT AAA TTG TAT GAA AAA TAT GTA TTG TGA
      D   A   E   E   T   Q   F   W   D   K   L   Y   E   K   Y   V   L   *
      TTTTATCTACACTTTCCATAGCATTTGTGGTGTTCCCTTTAGGGTCGAAAAATATAGCATTCTTATATAAGTAACAAGTTAA
      TACTAAACGGATATATTTGTTAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 1 斜纹夜蛾羧酸酯酶基因 *Slest2* 的核苷酸及其氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and the deduced amino acid sequences of carboxylesterase-like cDNA (*Slest2*) of *Spodoptera litura*

图中双下划线标示活性位点序列，方框标示组成催化三联体的氨基酸残基，下划线标示组成氧负离子孔的氨基酸残基。The carboxylesterase type-B serine active site was double underlined, three catalytic center residues (S, E and H) were boxed, and the residues composing of the oxyanion hole were underlined.

```
Slest2 : -------------------------------MVQVRVNEGLLEGERVDNHYGGSFYSFKGIPYAEPPVGD :  39
AcCE   : -----------------------------MERPEVKTLSGQVRGLKQISVEGIGFYAFKGIPYAKPPVGE :  41
CqAE   : ---------------------------MDVEHPVVPTQYGPVRGVRKLAATGVDYYSFQRIPYVQPPVGE :  43
DmAE   : -----------------------MSKESSLETCELTLPVGQIKGVKRLSLYDDPYFSFEKIPFAKTPLGE :  47
HiaE7  : MNFNVSFLEKLRWKIKCVENKILNYRLITNETHIVDTEYGKIKGVKRLTVYDDSFYSFEGIPYAKPPVGE :  70
LcE3   : MNFNVSLMEKLKWKIKCIENKFLNYRLTTNETVVAETEYGKWKGVKRLTVYDDSYYSFEGIPYAQPPVGE :  70

Slest2 : LRFKAPKPPKAWGGVRSAKEFGPKCYQNDLFMNTGIVGEEDCLYLNVYTPEIKPDKPLPVMFWIHGGGFF : 109
AcCE   : LRFKDPVPIEPWQEVREATEFGPMAACFD-VISKFSGGSDDCLYINVYTKKINSNVKQPVMFYIHGGGFI : 110
CqAE   : LRFKDAQPPKPWTEPLDCTVQGPGGYQYS-KLLNKIIGREDSLHMNVFTKNLDSKQLLPVMLYIHGGAFM : 112
DmAE   : LRFRAPVPADPWSGVLDCTHYAEKPTQRG-LLTREIEGGEDCLYLNVYSKQLKSEKPLPVMVYIYGGAFT : 116
HiaE7  : LRFKAPQRPVPWDGVKDCCHAASRSVQTD-FISGNSSGSEDCLYLNVYTNNLNTDTKRPVLVFFHGGGFI : 139
LcE3   : LRFKAPQRPTPWDGVRDCCNHKDKSVQVD-FITGKVCGSEDCLYLSVYTNNLNPETKRPVLVYIHGGGFI : 139

Slest2 : CGSGNDDLYGPEFLVRHGVILVTINYRVDVLGFLCLDTED--IPGNAGMKDQVQALRWVNKNIASFGGDP : 177
AcCE   : FGSGNDFFYGPDFLMRKDIVLVTFNYRLGVFGFLNLEHEV--APGNQGLKDQVMALKWVRDNIANFGGDS : 178
CqAE   : RGSSGVEMYGPDYLIQKDVVFVSFNYRIGALGFISFDSPELGLPGNAGLKDQNLALRWVVDNVANFGGDP : 182
DmAE   : VGEATRELYGPDYFMTKDVVLVTLNYRVDCLGFLSLKDPSLKVPGNAGLKDQVLALKWVKQYISNFNGDD : 186
HiaE7  : CGEANRNYYGADYFIKKDVVFITVQYRLGVLGFLSLNSENLNVPGNAGLKDQVMALRWIKNNCASFGGDP : 209
LcE3   : IGENHRDMYGPDYFIKKDVVLINIQYRLGALGFLSLNSEDLNVPGNAGLKDQVMALRWIKNNCANFGGNP : 209

               *
Slest2 : NNVTIFGESAGGGSVSYHLISPMSKGLFKRAIAQSGASTSPWAQA-VEPRERALALARSLGFYSE-DDKE : 245
AcCE   : ENVTIFGESAGGASVHYLTVSPLAKGLFHKAISQSGVFMNPWASVSGEPRKKAYELCELLG-KKTTDPVE : 247
CqAE   : KNITLFGESAGGCSVHYHMVSDLSRGLFQRAIVMSGCVLNNWSVVPRRKF--SERLAKALGWNGQGGERA : 250
DmAE   : SNITVFGESAGGCSTHFMMCTEQTRGLFHKAIPMSGTVHNYWANNPAEDF--AFRLAQQNGFTGENDDAK : 254
HiaE7  : DCITLFGESAGAASTHYMMITEQARGLFHRAVLMSGTAMCIWAHTQCQHR--GYTIAKRIGYKGENNDKD : 277
LcE3   : DNITVFGESAGAASTHYMMLTEQTRGLFHRGILMSGNAICPWANTQCQHR--AFTLAKLAGYKGEDNDKD : 277

Slest2 : LYEFFKNQPKESIVCIPVAPTFSEAFRGGLEINFTVVNEKKFGDNERFFYGDMLDAVSNGVHEGVEIWTG : 315
AcCE   : IVKFLRTVDTMKLIEHQGE-LQIQELQKKCLSAFVPGVDD--KSPNPFMP-FSREVAVEQ-AAHVPYLIG : 312
CqAE   : ALEVLVKADPESIVREQEVLLNENEIENRILFSFGPVIEP-YITKKCMIPKDPVEMCREAWSNEIDILIG : 319
DmAE   : VLEYLQGVPARDLVN--HNLLTPEHRRNGLLFAFGPTVEA-YVGEDCVVPKPPVEMARDAWSNNFPVMLG : 321
HiaE7  : VYDFLMKANPYDLAREEHKVLTNEELRDKVMFAFGPTTEP-YETPDCVLPKPNREMLKTAWGNSIPTLIG : 346
LcE3   : VLEFLMKAKPQDLIKLEEKVLTLEERTNKVMFPFGPTVEP-YQTADCVLPKHPREMVKTAWGNSIPTMMG : 346

             *
Slest2 : TTTEEGLIIFGDLEVTKKLLESARAFPESFISKQLAFTVPLNQQ-LKMGREFRKFYFKDQVNIPNDWDKW : 384
AcCE   : YNDREGTLLY-KIFENDDFESKNLR-FEEFIHPNFAETLKRKKISLE---DLKRMYFKNKKISKETTGKF : 377
CqAE   : GNSEEGLFCLNGI-KENPSIMSNLKDFEYLVPLEL-DLVRTSQRCKEVGKQMKKFYYGETEPSFENREGY : 387
DmAE   : GTSFEGLFMYPAVSANLKALDSLSQDPTRLVPVDVRTVS-SEKENLEYSQRLMKAYFGYSPPSSELLLNM : 390
HiaE7  : NTSYEGLL-FISVGKQNPHLIKELETFECYVPGELVVEDRSSPESLEIASILKKLYVRGETPTLE---SF : 412
LcE3   : NTSYEGLF-FTSILKQMPMLVKELETCVNFVPSELADAERTAPETLEMGAKIKKAHVTGETPTAD---NF : 412

                                                                     *
Slest2 : MNFVSMQMFGYPTMQWVR-HCAKAKKHKLYVVYKFSCKSKRNMIAVLRGLTEMLGDRQVTSHADDIAYLFN : 453
AcCE   : IDLFSDMYFIQGIHQVARVQAERNS-APTYMYQFTYDQG-P--NFSKGMFSID--EPGSTHMDELIYLFS : 441
CqAE   : LTLMTDKLFLHGLHRTILSRLNSKKPSKTFLYRFSVDS--DTYNHYRIVFCDKNVR-GTAHADDLSYIFK : 454
DmAE   : LDFYSYKIFWHGFNRTFNARLTYAK-APTYYYRFDFDSP-NF-NFYRAKFCGDKIKTGVAHADDLSYLFR : 457
HiaE7  : TELCSDFYFWYPMHRFLQLRFNHTVGSPIYLYRFDFDSE-EIINPYRIMRYGRGVK-GASHTDELTYLFW : 480
LcE3   : MDLCSHIYFWFPMHRLLQLRFNHTSGTPVYLYRFDFDSE-DLINPYRIMRSGRGVK-GVSHADELTYFFW : 480

Slest2 : PKLMKLK----VDTASEEFKLIERVATLWTNFAKY-GNPTPDDSLGVK---WAPYTLENQEY--LDIGNE : 513
AcCE   : MKFQETLNMEPIDKKSPHFRVMEQMVELWTNFAKY-GRPI-PAPTELLPVHWLPMN-DGTVLRYLNIGEE : 508
CqAE   : NVFNDPP-----AKDTFEHRAMMNMVGLFSTFASNNGNPNGEQIN--E---WESIATPAGPFKCLNINND : 514
DmAE   : NAGSWKL-----DKTSAEYRTIERMIGIWTAFAAT-SNPNCPEIGHLE---WKPSTKNDPK-RVINISSD : 517
HiaE7  : TMLSKRM-----PKDSREYKTIERMIGIWTQFATT-GNPYSPEINGMENTTWDSLKKSDEVYKCMNIGDE : 544
LcE3   : NQLAKRM-----PKESREYKTIERMTGIWIQFATT-GNPYSNEIEGMENVSWDPIKKSDEVYKCLNISDE : 544

Slest2 : -LKAGTAPDAEETQFWDKLYEKYVL-- : 537
AcCE   : -LRMEKVLNIEERYDYKLICHREKV-- : 532
CqAE   : GLQFIEYPEQERMKFWDSLYSKDK-LY : 540
DmAE   : -VTIIDLPEYEKLQIWDNLY-KPNQLI : 542
HiaE7  : -LKFIDLPEMEKLKVWQSVFNKKRELF : 570
LcE3   : -LKMIDVPEMDKIKQWESWFEKHRDLF : 570
```

图 2　斜纹夜蛾羧酸酯酶基因 *Slest2* 与其他 5 种昆虫的酯酶基因的氨基酸序列比对

Fig. 2　Amino acid sequence alignment of carboxylesterase-like enzyme gene (*Slest2*) from *Spodoptera litura* with the known esterase genes from other five insects

AcCE: Carboxylesterase of *Anisopteromalus calandrae* (GenBank accession no.: AF064523); CqAE: A2 esterase of *Culex pipiens quinquefasciatus* (GenBank accession no.: CAB06677); DmAE: Alpha esterase of *Drosophila melanogaster* (GenBank accession no.: AAB01146); HiaE7: Alpha E7 esterase of *Haematobia irritans irritans* (GenBank accession no.: AF139082); LCE3: Esterase E3 of *Lucilia cuprina* (GenBank accession no.: AAB67728). 羧酸酯酶 B 型丝氨酸活性位点以下划线标示，3 个催化活性位点（S，E 和 H）以星号标示。The carboxylesterase type-B serine active site was underlined, and the three catalytic center residues (S, E and H) were indicated with asterisks.

(GenBank 登录号：DQ445461)。根据所得 cDNA 的部分片段设计特异性引物，进行 5′-和 3′-RACE 后克隆得到全长基因 cDNA(图 1)。图 1 所示，该基因全长 1 796 bp，5′和 3′UTR 区分别长 63 和 119 bp，在 3′UTR 区有一加尾信号 AATATA；开放阅读框编码一个由 537 个氨基酸残基组成的羧酸酯酶蛋白。推导的氨基酸序列中包括 2 个糖基化位点：NVTI(179～182)和 NFTV (278～281)，一个羧酸酯酶 B 型丝氨酸活性位点 FGGDPNNVTIFGESAG。这一序列还包括 3 个活性位点：$Ser^{186}$，$Glu^{320}$ 和 $His^{444}$，对应于电鳐 *Torpedo californica* 中的氨基酸残基 $Ser^{200}$，$Glu^{327}$ 和 $His^{440}$ 组成催化三联体(Sussman *et al.*, 1991)。并与由 $Gly^{106}$，$Gly^{107}$ 和 $Ala^{187}$ 组成的氧负离子孔形成一个电子中转系统。

多重序列比对结果表明(图 2)，*Slest2* 与象虫金小蜂 *Anisopteromalus calandrae* 的羧酸酯酶(AF064523)，致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 的酯酶 A2 (CAB06677)，黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 α 酯酶 (AAB01146)，角蝇 *Haematobia irritans irritans* 的 α 酯酶 E7(AF139082)和铜绿蝇 *Lucilia cuprina* 的酯酶 E3 (AAB67728)的氨基酸相似性均在 30% 以上。将斜纹夜蛾 *Slest2* 氨基酸序列与部分已知的其他昆虫酯酶氨基酸序列比对后构建进化树，结果如图 3 所示。在鳞翅目昆虫中，斜纹夜蛾和甜菜夜蛾之间的同源性较斜纹夜蛾和棉铃虫之间的同源性高，这与它们在分类地位上的亲缘关系远近是一致的。同样，其他目的昆虫的酯酶与斜纹夜蛾 *Slest2* 的同源性则更低。

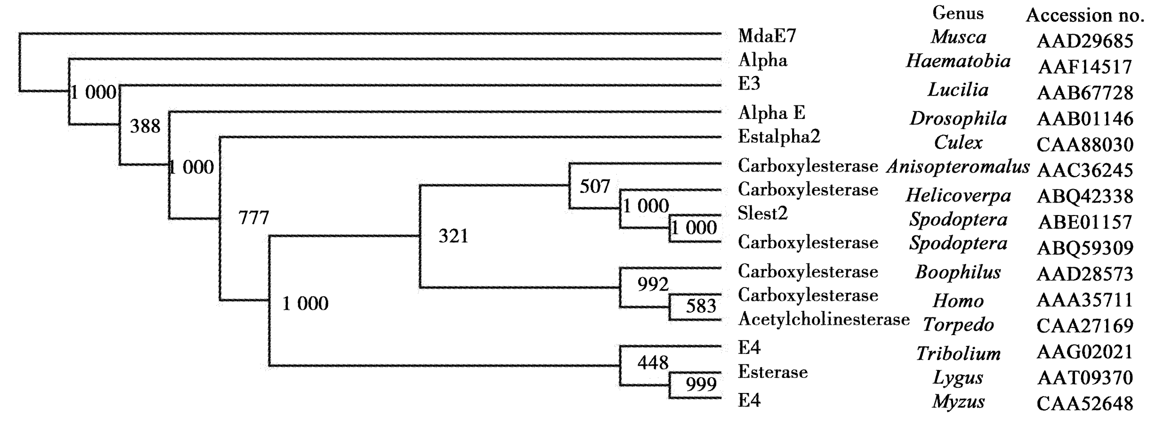



图 3 斜纹夜蛾羧酸酯酶与其他酯酶进化分析

Fig. 3 Phylogenetic relationship between the carboxylesterase of *Spodoptera litura* and other esterases

### 2.2 斜纹夜蛾羧酸酯酶基因在抗、感品系的表达水平

采用比较 $C_T$ 值的相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_T}$法)计算了斜纹夜蛾酯酶基因 *Slest2* 在抗、感品系中的转录活性和拷贝数差异(表 2)。

**表 2 斜纹夜蛾酯酶基因 *Slest2* 在抗、感品系 3 龄幼虫中的转录活性和拷贝数(用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$法计算)**

**Table 2 The transcription level and copy number of *Slest2* in the 3rd instar larvae of the resistant and susceptible strains of *Spodoptera litura* (calculated with $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method)**

| 模板 Template | 敏感品系 Susceptible strain | 抗性品系 Resistant strain | 比值[b] Ratio |
|---|---|---|---|
| cDNA | 1(0.92－1.09)[a] | 46.85 (43.41－50.57) | 46.85 |
| gDNA | 1(0.92－1.09) | 1.16(1.06－1.27) | 1.16 |

[a] *Slest2* 相对表达量的范围是采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算所得 The range given for gene expression level is determined by evaluating $2^{-\Delta\Delta C_T}$ with $\Delta\Delta C_T + SE$ and $\Delta\Delta C_T - SE$, where *SE* is the standard error of the $\Delta\Delta C_T$ value. The transcription level and the copy number of *Slest2* in the susceptible strain are used as a calibrator, respectively. [b] 比值 = *Slest2* 在抗性品系中的表达量/该基因在敏感品系中的表达量。Ratio = relative expression level of the resistant strain/relative expression level of the susceptible strain.

从表 2 可看出，以 cDNA 为模板时，*Slest2* 在抗性品系中的相对表达量是在敏感品系中的 46.85 倍；当以基因组 DNA 为模板时，*Slest2* 在抗性品系中的相对拷贝数是在敏感品系中的 1.16 倍。这些结果表明，与敏感品系相比，*Slest2* 在抗性品系中的转录水平较高，但其基因拷贝数并无明显差异。

## 3 讨论

酯酶是昆虫体内一种重要的解毒酶系，它可以通过水解酯类毒性化合物的酯键，或与亲脂类有毒化合物结合，降低其有效浓度，来降低有毒化合物的毒性。而许多杀虫剂分子是含有酯键的酯类化合物，如有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂，因此，酯酶在昆虫对这几类杀虫剂的抗性中起着重要的作用(McCaffery, 1998; Hemingway *et al.*, 2004; Heidari *et al.*, 2005)。大量研究表明，酯酶

活性上升是致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*、淡色按蚊 *Anopheles albimanus*、家蝇 *Musca domestica*、桃蚜 *Myzus persicae*、澳洲棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 对拟除虫菊酯产生抗性的重要原因之一（Sahgal *et al*.,1994；Gunning *et al*., 1997；Lee and Clark, 1998；Chareonviriyaphapa *et al*.,1999；帅霞和王进军, 2005；Zhang *et al*., 2007）。

对多种昆虫及动物的羧酸酯酶基因序列的比对发现，所有的羧酸酯酶都含有一个保守的活性中心序列，即 TIFGESAGA；同时都具有催化三联体，如褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 编码羧酸酯酶基因的 cDNA 中是由 $Ser^{215}$，$Glu^{345}$ 和 $His^{466}$ 组成（Small and Hemingway, 2000），在铜绿蝇中是 $Ser^{218}$，$G1u^{351}$ 和 $His^{471}$（Newcomb *et al*., 1997a），在微小牛蜱 *Boophilus microplus* 中是 $Ser^{224}$，$Glu^{351}$ 和 $His^{464}$（Hernandez *et al*., 2000）等。本文采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了斜纹夜蛾酯酶的全长 cDNA，并对其核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行了分析。结果表明，该基因推导的氨基酸序列具有羧酸酯酶的保守结构，例如：羧酸酯酶 B 型丝氨酸活性位点 FGGDPNNVTIFGESAG；催化三联体活性位点：$Ser^{186}$，$Glu^{320}$ 和 $His^{444}$，近 N 端有 2 个糖基化位点：NVTI（179～182）和 NFTV（278～281）。用 SignalP（http://www. cbs. dtu. dk /services/SignalP/）分析表明该酯酶并不存在信号肽序列，这与铜绿蝇的酯酶 E3（AAB67728）（Newcomb *et al*., 1997a）和金小蜂的羧酸酯酶（AF064523）（Zhu *et al*., 1999）的序列结构类似，具有 α 酯酶的共有特征（Robin *et al*., 1996）。而酯酶是否含有信号肽序列与抗药性之间并无必然关系，因为有的与抗性相关的酯酶含有信号肽序列，例如桃蚜 *M. persicae* 的 E4 酯酶（Field *et al*., 1993）；而有的与抗性相关的酯酶却不含有信号肽序列，例如铜绿蝇的酯酶 E3（Newcomb *et al*., 1997a）。

大量研究表明，酯酶可以通过基因扩增和酯酶催化活性位点的突变引起昆虫对杀虫剂的抗性。基因扩增是通过改变基因组中某些基因的数量而使其产物增加的过程，是桃蚜、棉蚜、褐飞虱和蚊虫对有机磷产生抗性的根本原因（Field *et al*., 1988；Small and Hemingway, 2000；Hemingway *et al*., 2004；Pan *et al*., 2009）。而在抗性铜绿蝇和家蝇 *Musca domestica* 中，均发现了酯酶基因的突变位点（G137D, W251L/S）（Newcomb *et al*., 1997b；Campbell *et al*., 1998），这些突变导致了酯酶同功酶的改变以及对有机磷杀虫剂的解毒活性的提高（Devonshire *et al*., 2003）。此外，羧酸酯酶基因 mRNA 表达量的增加也常常导致昆虫抗药性的产生。Zhu 等（1999）对马拉松敏感和抗性金小蜂的羧酸酯酶基因研究发现，抗性品系酯酶的 mRNA 表达量是敏感品系的 30 倍。在美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvols 马拉硫磷抗性品系中，其酯酶基因 mRNA 表达量是敏感品系的 5.1 倍，表明酯酶基因的过量表达与美国牧草盲蝽对马拉硫磷抗性密切相关（Zhu *et al*., 2004）。在微小牛蜱抗拟除虫菊酯类的 Cz 品系中，其羧酸酯酶的 mRNA 的表达量也明显较敏感品系的高（Hernandez *et al*, 2002）。本研究利用实时定量 PCR 技术检测了斜纹夜蛾羧酸酯酶基因 *Slest2* 在溴氰菊酯抗性和敏感品系中的相对转录活性和拷贝数，结果表明，羧酸酯酶基因 *Slest2* 在抗性品系中的 mRNA 的表达量是敏感品系的 46.85 倍；而在基因组水平上，该基因在抗、感品系中的拷贝数并没有明显差异，表明在斜纹夜蛾抗性品系中并没有发生酯酶基因扩增的事件。据此可以推测，酯酶基因 *Slest2* 的过量表达可能是斜纹夜蛾对溴氰菊酯产生抗性的分子机制之一。尽管前期的生化测定结果表明斜纹夜蛾酯酶具有一定的降解溴氰菊酯的能力（黄水金等, 2009），但尚不明确是否是羧酸酯酶基因 *Slest2* 在其中发挥作用。因此，下一步工作将对羧酸酯酶基因 *Slest2* 进行体外表达，检测其表达产物的活性及其降解溴氰菊酯的能力，以期进一步明确该基因与斜纹夜蛾对溴氰菊酯抗性的关系。

## 参 考 文 献（References）


Armes NJ, Wightman JA, Jadhav DR, Rao GVR, 1997. Status of insecticide resistance in *Spodoptera litura* in Andhra Pradesh, India. *Pestic. Sci*., 50: 240－248.

Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, Oakeshott JG, 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 28(3): 139－150.

Chareonviriyaphapa T, Golendab CF, Robertsc DR, Andre RG, 1999. Identification of elevated esterase activity in a pyrethroid-resistant population of *Anopheles albimanus* Wiedemann. *ScienceAsia*, 25: 153－156.

Cho JR, Kim YJ, Kim JJ, Kim HS, Yoo JK, Lee JO, 1999. Electrophoretic pattern of larval esterases in field and laboratory-selected strains of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius). *J. Asia Pacific Entomol*., 2: 39－44.

Devonshire AL, Heidari R, Bell KL, Campbell PM, Campbell BE, Odgers WA, Oakeshott JG, Russell RJ, 2003. Kinetic efficiency of mutant carboxylesterases implicated in organophosphate insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 76: 1 – 13.

Field LM, Devonshire AL, Forde BG, 1988. Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myxzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochem. J.*, 251: 309 – 312.

Field LM, Williamson MS, Moores GD, Devonshire AL, 1993. Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer.). *Biochem. J.*, 294: 569 – 574.

Gao CX, Bei YW, Chen TH, Gu XH, 2004. On factors causing outbreak of *Spodoptera litura* (Fabricius). *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 16(5): 332 – 335. [高春先, 贝亚维, 陈庭华, 顾秀慧, 2004. 斜纹夜蛾成灾因子分析. 浙江农业学报, 16(5): 332 – 335]

Gunning RV, Moores GD, Devonshire AL, 1997. Esterases and fenvalerate resistance in a field population of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 58: 155 – 162.

Heidari R, Devonshire AL, Campbell BE, Dorrian SJ, Oakeshott JG, Russell RJ, 2005. Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by *in vitro* mutagenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 597 – 609.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 653 – 665.

Hernandez R, He HQ, Chen AC, Waghela SD, Ivie GW, George JE, Wagner GG, 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(10): 969 – 977.

Hernandez R, Guerrero FD, George JE, Wagner GG, 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 1 009 – 1 016.

Huang SJ, Han ZJ, 2007. Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 87: 14 – 22.

Huang SJ, Qin WJ, Liu H, 2009. Biochemical survey of esterase from deltamethin-susceptible and deltamethin-resistant strains of common cutworm, *Spodoptera litura*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 21(1): 64 – 68. [黄水金, 秦文婧, 刘辉, 2009. 斜纹夜蛾溴氰菊酯抗性和敏感品系酯酶的生化特性研究. 江西农业学报, 21(1): 64 – 68]

Huang SJ, Xu JF, Han ZJ, 2006. Baseline toxicity data of insecticides against the common cutworm *Spodoptera litura* (Fabricius) and a comparison of resistance monitoring methods. *Int. J. Pest Manag.*, 52(3): 209 – 213.

Kranthi KR, Jadhav DR, Wanjari RR, Ali SS, Russell D, 2001. Carbamate and organophosphate resistance in cotton pests in India, 1995 to 1999. *Bull. Entomol. Res.*, 91: 37 – 46.

Kranthi KR, Jadhav DR, Kranthi S, Wanjari RR, Ali SS, Russell DA, 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. *Crop Protection*, 21: 449 – 460.

Lee SH, Clark JM, 1998. Permethrin carboxylesterase functions as nonspecific sequestration proteins in the hemolymph of Colorado potato beetle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 62: 51 – 63.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

McCaffery AR, 1998. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353: 1 735 – 1 750.

Newcomb RD, Campbell PM, Russell RJ, Oakeshott JG, 1997a. cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 15 – 25.

Newcomb RD, Campbell PM, Ollis DL, Cheah E, Russell RJ, Oakeshott JG, 1997b. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7 464 – 7 468.

Pan Y, Guo HL, Gao XW, 2009. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 152: 266 – 270

Qin HG, Wang DD, Ding J, Huang RH, Ye ZX, 2006. Host plants of *Spodoptera litura*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 18(5): 51 – 58. [秦厚国, 汪笃栋, 丁建, 黄荣华, 叶正襄, 2006. 斜纹夜蛾寄主植物名录. 江西农业学报, 18(5): 51 – 58]

Qin HG, Ye ZX, Huang SJ, Ding J, Luo RH, 2004. The correlations of the different host plants with preference level, life duration and survival rate of *Spodoptera litura* Fabricius. *Chin. J. Eco-Agric.*, 12: 40 – 42. [秦厚国, 叶正襄, 黄水金, 丁建, 罗任华, 2004. 不同寄主植物与斜纹夜蛾喜食程度、生长发育及存活率的关系研究. 中国生态农业学报, 12: 40 – 42]

Robin C, Russell RJ, Medveczky KM, Oakeshott JG, 1996. Duplication and divergence of the genes of the α-esterase cluster of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Evol.*, 43: 241 – 252.

Sahgal A, Kumar S, Pillai MKK, 1994, Microplate assay of elevated esterase activity in individual pyrethroid-resistant mosquitoes. *J. Biosci.*, 19(2): 193 – 199

Shuai X, Wang JJ, 2005. Change in esterase activity and content during the selection of resistance to alphamethrin in *Myzus persicae*. *Zoological Research*, 26(1): 101 – 105. [帅霞, 王进军, 2005. 桃蚜高效氯氰菊酯抗性选育过程中酯酶含量和活性变化. 动物学研究, 26(1): 101 – 105]

Small GJ, Hemingway J, 2000. Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.*, 9(6): 647 – 653.

Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L,

Silman I, 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding enzyme. *Science*, 253: 872 – 879.

Zhang L, Gao XW, Liang P, 2007. Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89: 65 – 72

Zhu LM, Ni YP, Cao XY, Huang CX, Cui Q, 2001. A method for artificially rearing to the cotton leafworm *Prodenia litura* Fabricius. *Entomological Knowledge*, 38(3): 67 – 68. [朱丽梅，倪钰萍，曹晓宇，黄春霞，崔勤，2001. 斜纹夜蛾的人工饲养技术. 昆虫知识，38(3): 67 – 68]

Zhu YC, Dowdy AK, Baker JE, 1999. Differential mRNA expression levels and gene sequences of a putative carboxylesterase-like enzyme from two strains of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 417 – 425.

Zhu YC, Snodgrass GL, Chen MS, 2004. Enhanced esterase gene expression and activity in a malathion-resistant strain of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Biochem Mol. Biol.*, 34: 1 175 – 1 186.

（责任编辑：赵利辉）